



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB  
CURSO DE FARMÁCIA**

**JULYANNA DE LIMA MARQUES**

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DO ÍNDICE DE QUALIDADE (MIQ) E  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CURIMBA (*PROCHILODUS LINEATUS*)**

**BRASÍLIA, DF  
2017**

JULYANNA DE LIMA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DO ÍNDICE DE QUALIDADE (MIQ) E  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CURIMBA (*PROCHILODUS LINEATUS*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF  
2017

JULYANNA DE LIMA MARQUES

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DO ÍNDICE DE QUALIDADE (MIQ) E  
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CURIMBA (*PROCHILODUS LINEATUS*)**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire  
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF  
2017

Md Marques, Julyanna de Lima  
Desenvolvimento do Método do Índice de Qualidade (MIQ) e Avaliação Microbiológica do Curimba (*Prochilodus Lineatus*) / Julyanna de Lima Marques; orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2017. 51 p.

Monografia (Graduação - Farmácia ) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. Curimba. 2. *Prochilodus lineatus*. 3. MIQ. 4. Qualidade microbiológica. 5. Análise molecular. I. Orsi, Daniela Castilho, orient. II. Rodrigues da Silva, Izabel Cristina, co-orient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, a Deus e Nossa Senhora por toda proteção e bênçãos durante esses anos de graduação, por não me deixarem desistir nos momentos de agonia.

À minha família, meus pais, Claudia de Lima e Emanuel Marques de Souza, por serem meu porto seguro, meus maiores incentivadores, seres humanos no qual me espelho. Sou eternamente grata a vocês por terem me dado condições para que eu pudesse realizar meus sonhos. Ao meu irmão, João Marcello de Lima Marques, pelos momentos de descontração e pela torcida. Saibam que me sinto muito abençoada por ter vocês como família e que não meço esforços para vê-los felizes. Aos demais familiares, que de modo indireto também torceram por mim.

Ao meu namorado, Giovanni Oliveira Monteiro, por todo apoio e compreensão nos momentos árdusos, por sempre ser esse companheiro que batalha lado a lado, me dando forças para continuar na luta pelos meus objetivos. Obrigada por ser luz no meu dia-a-dia e por todo amor.

Às minhas amigas Jessica Alves de Sousa, Veronica Alves dos Santos e Amanda Beatriz Santos Oliveira, por terem compartilhado diariamente dos momentos de aflição e alegria, por serem meus anjos na universidade e também às minhas amigas de ensino médio, Naiara dos Santos Almeida, Carolina Silva Vogado, Gabriela Tuylla Pinto Rodrigues e Marina Ximenes de Melo pelo amor e apoio incondicional mesmo que, muitas vezes, distante.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi, por ser uma profissional incrível e dedicada. Muito obrigada pela confiança, amizade e por me acolher durante esses anos de iniciação científica.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por toda dedicação, apoio e valiosa orientação.

Ao professor, Msc. Daniel Oliveira Freire, por aceitar participar da minha banca examinadora.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

## RESUMO

A promoção de hábitos de vida saudável aumentou o consumo do pescado em todo o mundo por ser uma importante fonte de proteínas, vitaminas, minerais e possuir um teor elevado de ácidos graxos poli-insaturados. Contudo, para que os benefícios nutricionais da carne proveniente de peixes possam ser usufruídos, a segurança e qualidade do pescado necessitam ser assegurados. O curimba (*Prochilodus lineatus*), também conhecido como curimbatá, é um peixe de água doce nativo que apresenta importância econômica e social, principalmente, para a pesca artesanal de subsistência, nos estados da região Nordeste do Brasil. Caracteriza-se por possuir bom desenvolvimento em cativeiro, podendo também ser aproveitado para aquicultura. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver o Método do Índice de Qualidade (MIQ) para o curimba cultivado e aplicá-lo no estabelecimento da sua vida útil. Também foram pesquisadas as condições microbiológicas de seis amostras do curimba fresco exposto ao consumo numa peixaria de um hipermercado de Brasília. Os resultados das análises microbiológicas mostraram que 2 amostras (amostras 3 e 4) apresentaram contagens de bactérias psicrótróficas acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g, podendo ser considerados produtos com a qualidade comprometida. Verificou-se que 2 amostras (amostras 1 e 4) estavam impróprias para o consumo, devido à presença da bactéria *Salmonella spp.* (confirmada geneticamente). A aplicação do Método de Índice de Qualidade (MIQ) para avaliação da vida útil do curimba inteiro, fresco e conservado em gelo foi realizada e o prazo de validade comercial do curimba ficou estabelecido entre 6 e 8 dias de estocagem no gelo.

**Palavras chave:** Curimba. *Prochilodus lineatus*. MIQ. Qualidade microbiológica. Análise molecular.

## ABSTRACT

Promoting healthy living habits increased consumption of fish worldwide for being an important source of proteins, vitamins, minerals and have a high content of polyunsaturated fatty acids. However, in order for the nutritional benefits of meat from fish to be enjoyed, the safety and quality of fish need to be ensured. The Curimba (*Prochilodus lineatus*), also known as curimatá, is a native freshwater fish that presents economic and social importance, mainly for subsistence artisanal fishing, in the states of Northeastern Brazil. It is characterized by having good development in captivity and can also be used for aquaculture. The objective of the present study was to develop the Quality Index Method (MIQ) to the curimba cultivated and to apply it in the establishment of its useful life. Microbiological conditions were also investigated of six fresh curimba samples exposed to consumption in fishmongers in a hypermarket in Brasilia. The results of the microbiological analyzes showed that 2 samples (Samples 3 and 4) showed psychrotrophic bacteria counts above  $1.0 \times 10^7$  CFU / g, may be considered products with compromised quality. It was found that 2 samples (samples 1 and 4) were unfit for consumption, due to the presence of the bacterium *Salmonella* spp. (Genetically confirmed). The implementation of the Quality Index Method (MIQ) for evaluation of the shelf life for the entire curimba, fresh and stored on ice was performed, and the commercial shelf-life of the curimba was established between 6 and 8 days of ice storage.

**Key words:** Curimba. *Prochilodus lineatus*. MIQ. Microbiological quality. Molecular analysis.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1.	Produção do pescado no Brasil e consumo no Distrito Federal .....	10
1.2.	A aquicultura do curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ) no Brasil.....	11
1.3.	Fatores determinantes na qualidade do pescado .....	13
1.4.	O pescado como veículo transmissor de bactérias patogênicas ao homem	14
1.5.	Avaliação sensorial do frescor do pescado e o Método do Índice de Qualidade (MIQ) .....	17
1.6.	Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas .....	19
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1.	Objetivo geral .....	21
2.2.	Objetivos específicos .....	21
3.	JUSTIFICATIVA.....	22
4.	METODOLOGIA .....	23
4.1.	Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas .....	23
4.2.	Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas .....	23
4.3.	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes .....	23
4.4.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	25
4.5.	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
4.6.	Análises moleculares e extração de DNA bacteriano .....	27
4.7.	Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR.....	28
4.8.	PCR qualitativo .....	29
4.9.	Eletroforese em gel de agarose .....	30
4.10.	Método do índice de qualidade (MIQ) .....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1.	Análises microbiológicas e moleculares .....	32
5.1.1.	Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas .....	32
5.1.2.	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes .....	34
5.1.3.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	35
5.1.4.	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
5.1.5.	Método do índice de qualidade (MIQ) para o curimba de cativeiro (peixe inteiro e eviscerado).....	39
6.	CONCLUSÕES.....	45
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias patogênicas potencialmente transmitidas ao homem a partir de peixes e produtos à base de peixe.....	15
Tabela 2. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	25
Tabela 3. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	29
Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	29
Tabela 5. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de curimba .....	32
Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de curimba .....	34
Tabela 7. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de curimba.....	36
Tabela 8. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de curimba.....	37
Tabela 9. Identificação por meio de PCR de bactérias de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas das amostras de curimba comercializadas em Brasília – DF. ....	38
Tabela 10. Esquema do MIQ do curimba de cativo (peixe inteiro).....	39
Tabela 11. Índice de qualidade (IQ) e tempo de estocagem em gelo (em dias) para o esquema do MIQ do curimba (peixe inteiro).....	42
Tabela 12. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de curimba mantidas em gelo por 8 dias.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ) .....	11
Figura 2. Exemplar da musculatura do curimba .....	12
Figura 3. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI..	26
Figura 4. Amostra com IQ ZERO .....	40
Figura 5. Amostra com IQ 18 .....	41

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.....	51
--------------	----

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1. Produção do pescado no Brasil e consumo no Distrito Federal**

A definição genérica de “pescado” compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana. Já o pescado fresco é aquele que não passou por qualquer processo de conservação, a não ser a própria ação do gelo (FURTADO, 2016).

A produção brasileira de pescado, em 2011, foi de 1,4 milhão de toneladas, sendo a pesca responsável por 803,2 mil toneladas e a aquicultura por 628,7 mil toneladas (BRASIL, 2013). Entende-se por aquicultura a criação de animais aquáticos em condições controladas, com o objetivo de produção de alimentos para o homem (AYROZA, 2009; OLIVEIRA, 2009).

O Brasil possui uma alta expectativa de crescimento da produção de pescado na aquicultura, visto que o país conta com características favoráveis ao desenvolvimento das mais diversas modalidades aquícolas. O Brasil possui 12% da água doce do planeta, 5,5 milhões de hectares de lâmina d’água em reservatórios públicos, um litoral de 8.500 km e clima tropical na maior parte do território. Esses atributos credenciam o país como um dos poucos aptos no mundo a ter condições de aumentar a oferta de pescado nos próximos anos. Essa condição é corroborada pela taxa média de crescimento da aquicultura, superior a 10% ao ano na última década (BRABO et al., 2016).

O Distrito Federal é o segundo mercado consumidor de pescado do país, ficando atrás somente de São Paulo. Como a carne do pescado é saudável comparada aos outros tipos de carne e possui alto teor de proteínas animais, esse alimento vem despertando o interesse da população candanga. No período de 2007 a 2011, o consumo anual médio de pescado por habitante em Brasília passou de 12,8 kg para 14 kg, valor acima da média nacional que é aproximadamente 9 kg per capital (ARAÚJO, 2015).

## 1.2. A aquicultura do curimba (*Prochilodus lineatus*) no Brasil

O curimba (*Prochilodus lineatus*), também conhecido como curimbá, curimbatá ou grumatã é um peixe de água doce nativo das bacias dos rios Paraná, Paraguai e São Francisco (KALOUS et al., 2012). A espécie *Prochilodus lineatus* pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Prochilodontidae (CUADRADO, 2013; TAFFAREL, 2013). É um peixe que atinge até 70 cm e pode atingir até 6 kg de peso corporal. De cor cinza-esverdeada, o corpo é mais escuro no dorso, aclarando-se no ventre, que é mais prateado (Figura 1) (ORFÃO, 2006).



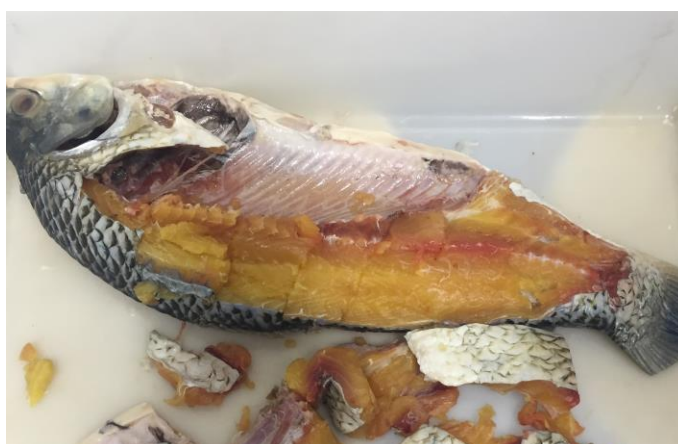
**Figura 1.** Exemplar de curimba (*Prochilodus lineatus*)

O curimba é uma espécie detritívora (alimenta-se de restos orgânicos), sendo, assim, caracterizado como iliófago (peixes que se alimentam de organismos bentônicos que são os organismos que vivem no fundo do rio). Devido a essa característica, o curimba tem importante função na cadeia alimentar do ambiente aquático, uma vez que promove a limpeza do fundo dos rios (ORFÃO, 2006). Os peixes dessa espécie realizam grandes deslocamentos ao longo dos rios durante os períodos chuvosos para realizar sua reprodução, fenômeno denominado piracema (COSTA et al., 2015).

O curimba apresenta importância econômica e social para a pesca artesanal de subsistência, nos estados da região Nordeste do Brasil, onde tanto a carne quanto os óvulos (“caviar do sertão”) possuem boa aceitação no consumo alimentar (COSTA et al., 2015; TAFFAREL, 2013). Nas regiões norte e nordeste do Brasil a carne do curimba é bastante apreciada e consumida por populações ribeirinhas,

embora seu preço de mercado seja menor comparado a outros peixes (ORFÃO, 2006).

No trabalho de Machado e Foresti (2009), foi analisada a composição da carne do curimba (*Prochilodus lineatus*) pescado no rio Mogi Guaçu. O teor de proteína encontrado nos filés de curimba *in natura* foi de 18,67% e o teor de lipídios totais foi de 3,16%. O curimba foi caracterizado como pescado magro, uma vez que apresentou teor de gordura abaixo de 5%. A figura 2 apresenta um foto da musculatura do curimba, mostrando que a carne tem uma cor amarelo forte (laranja), provavelmente em decorrência do acúmulo de carotenoides no músculo da carne, assim, como acontece com o salmão (*Salmo salar*), onde a deposição natural de pigmentos carotenoides no músculo da carne resulta da dieta dos salmões, composta por camarões, peixes e algas marinhas (TONIAL et al., 2010).



**Figura 2.** Exemplar da musculatura do curimba

Entre as espécies brasileiras nativas, o curimba pode ser aproveitado para aquicultura, apresentando bom desenvolvimento em cativeiro. Essa espécie caracteriza-se pela sua rusticidade em cultivo, além da elevada taxa de crescimento podendo atingir até 800 gramas no primeiro ano de cultivo (COSTA et al. 2015; ORFÃO, 2006).

As estações de piscicultura têm grande interesse no sucesso da sua reprodução, uma vez que as larvas de curimba servem de alimento para espécies carnívoras de grande importância comercial, como, por exemplo, o dourado (*Salminus brasiliensis*), a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o jaú (*Zungaro jahu*) (NASCIMENTO, 2013).

Usinas hidrelétricas utilizam essa espécie em programas de repovoamento de reservatórios, pois além de servir como espécie-modelo no desenvolvimento de pesquisas em biotecnologia reprodutiva, o curimba apresenta facilidade de manejo (VIVEIROS et al., 2010).

### 1.3. Fatores determinantes na qualidade do pescado

O peixe devido a sua constituição tecidual (constituição frouxa do tecido conjuntivo e tecido rico em proteínas, fosfolipídios e ácidos graxos polinsaturados), torna-se mais susceptível às alterações enzimáticas, oxidativas e microbiológicas do que as demais carnes brancas ou vermelhas, sendo um produto altamente perecível (BARTOLOMEU et al., 2011). Fatores extrínsecos como métodos de captura que provocam morte lenta e os inúmeros microrganismos presentes na água e na microbiota natural (localizada principalmente nos intestinos, brânquias e muco superficial), também contribuem para sua rápida deterioração (TEXEIRA e GARCIA, 2014).

Os métodos de captura do pescado influenciam na sua qualidade. Se o pescado se debate tentando se libertar das redes de pesca ou morre em agonia nos barcos pesqueiros, ocorre o esgotamento de suas reservas de energia (glicogênio), ocasionando um *rigor mortis* mais rápido e, conseqüentemente, uma deterioração mais acelerada e intensa da carne. Portanto, quanto mais glicogênio é armazenado, maior é o tempo de vida útil do produto (SOARES e GONÇALVES, 2012).

Após a captura ou abate e morte, os peixes são normalmente armazenados em gelo, dando origem a alterações na microflora. No armazenamento, o fator ambiental mais importante que influencia a composição da microflora de peixe é a temperatura. Peixes de águas tropicais têm tipicamente níveis mais elevados de bactérias mesófilas que peixes de águas temperadas. No entanto, quando armazenados no gelo, as bactérias psicotróficas assumem papel relevante no processo de deterioração. Ambos os psicotróficos e mesófilos crescem bem à temperatura ambiente (20-35°C) e a deterioração ocorre em 1-2 dias em temperaturas acima de 15°C. A microflora de peixes vivos de águas tropicais geralmente inclui membros do gênero *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Corynebacterium* e *Micrococcus* (ICMSF, 2005).

O gelo é um excelente meio de prolongar o frescor do pescado, uma vez que retarda a multiplicação bacteriana. Porém, se o gelo for fabricado em más condições higiênico-sanitárias, pode se tornar um fator de risco para os consumidores. Apesar de o gelo não ser um meio de cultivo (devido à falta de nutrientes necessários ao bom desenvolvimento microbiano), se ele for má qualidade sanitária, poderá funcionar como um veículo de contaminação do pescado e comprometer sua qualidade (BALDIN, 2011). Desse modo, torna-se importante saber a procedência do gelo utilizado na manutenção da cadeia do frio durante a produção e comercialização do pescado fresco.

Procedimentos inadequados em qualquer fase de produção do pescado podem propiciar a contaminação da carne. A manipulação incorreta pode propiciar a ruptura da cavidade abdominal e a exposição por longo tempo à temperatura ambiente. A filetagem utilizando utensílios contaminados e mesas não higienizadas, os manipuladores que usam roupas e instrumentos inadequados, o transporte sem nenhum cuidado com a manutenção da temperatura e a falta de refrigeração nos pontos de comercialização são fatores que aceleram os processos de deterioração do pescado. Logo, as características microbiológicas do pescado ao ser adquirido pelo consumidor refletem as condições higiênicas e sanitárias de todo o seu processamento (AMARAL e FREITAS, 2013).

#### **1.4. O pescado como veículo transmissor de bactérias patogênicas ao homem**

Os produtos pesqueiros quando não são obtidos, armazenados e processados corretamente em condições higiênicas adequadas podem ser disseminadores de bactérias patogênicas para o homem (ECHEVENGUA et al., 2008). A qualidade microbiológica é um dos itens mais avaliados pela indústria de processamento do pescado, visando à segurança alimentar (SOARES e GONÇALVES, 2012).

As doenças transmitidas por alimentos (DTAS's) representam um importante problema de saúde pública, por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo. (SOARES e GONÇALVES, 2012). As DTAS's podem ser divididas em intoxicações alimentares (quando se ingere a toxina produzida por um microrganismo que se multiplicou no alimento) e infecções alimentares (quando o agente causador se

multiplicou no alimento e é ingerido vivo e pode produzir enterotoxinas, causando uma toxi-infecção alimentar e/ou invadir a mucosa intestinal, podendo disseminar-se para outros órgãos) (PEREIRA, 2013).

O peixe e produtos a base de peixe causaram 184 casos de DTAS's, ou seja, representaram 19% dos 967 surtos de origem alimentar (com causa conhecida) nos Estados Unidos de 1993 a 1997. No Japão, entre 1999 e 2001, o Ministério Japonês da Saúde, Trabalho e Bem-Estar notificou 594 surtos de origem alimentar relacionados ao consumo de peixe, com 10.212 pessoas acometidas e 6 casos de morte (ICMSF, 2005).

De acordo com o ICMSF (2005), as bactérias patogênicas encontradas no pescado com maior frequência estão listadas na Tabela 1. Estes microrganismos são classificados de acordo com a sua origem: no ambiente aquático, no ambiente geral ou contaminação por poluição das águas e processos inadequados de cultivo e processamento.

**Tabela 1. Bactérias patogênicas potencialmente transmitidas ao homem a partir de peixes e produtos à base de peixe.**

<b>Origem</b>	<b>Bactéria</b>
<b>Ambiente aquático</b>	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Aeromonas</i> spp. <i>Plesiomonas</i>
<b>Ambiente geral</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium botulinum</i>
<b>Poluição das águas e processos inadequados de cultivo e processamento</b>	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

Fonte: adaptado de ICMSF (2005)

Algumas bactérias patogênicas para os seres humanos são parte da microflora normal do ambiente marinho. Estas incluem alguns tipos psicrótrófos de *Clostridium botulinum* e várias espécies de *Vibrio*. *Plesiomonas shigelloides* e



*Aeromonas hydrophila* também são bactérias aquáticas que foram associadas com gastroenterite em seres humanos. *Listeria monocytogenes* ocorre no ambiente geral e pode ser isolada particularmente de peixe capturado ou cultivado perto de terra com escoamento agrícola. Esse patógeno de origem alimentar é de particular importância nos produtos prontos para consumo. Recentemente, produtos como truta defumada e mexilhões defumados foram implicados em casos de listeriose humana (ICMSF, 2005).

Bactérias patogênicas como *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica* podem ser frequentemente isoladas de peixes, mas provavelmente refletem o resultado de poluição fecal humana e animal das águas. Estes organismos tipicamente originam-se do reservatório humano-animal. Entretanto, alguns estudos mostraram que uma vez introduzidos em águas mornas, *Salmonella* e *E. coli* podem persistir por longos períodos de tempo (ICMSF, 2005).

A regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos disposta na RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) determina para o pescado, a contagem de *Staphylococcus aureus*, coliformes termotolerantes e a pesquisa de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra.

Os estafilococos são bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae*, Gram-positivas, que podem ser encontradas isoladas, aos pares e em grupamentos irregulares. São imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos. A temperatura ótima de multiplicação é de 30 - 37°C. Entre as bactérias desse gênero, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à capacidade de grande parte de suas cepas produzirem enterotoxinas. O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*, sendo a cavidade nasal do homem seu principal habitat e pode ser encontrado em 30 a 50% dos indivíduos saudáveis. Geralmente, este microrganismo é transmitido aos alimentos por seus manipuladores. *Staphylococcus aureus* é responsável por aproximadamente 45% dos casos de DTAS's do mundo (SANTIAGO et al., 2013; ZOCHE e SILVA, 2012; SANTANA et al., 2010; BARBOSA, 2013).

*Escherichia coli* é uma bactéria bacilo Gram-negativo, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e anaeróbia facultativa. *Escherichia coli* é a principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes, também denominados, coliformes a 45°C, ou seja, com capacidade de fermentar a lactose quando

incubados na temperatura de 44-45,5°C. Destaca-se por causar doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos contaminados. Tem como habitat o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente e, portanto, sua presença no meio indica contaminação fecal (SANTIAGO et al., 2013; ARAÚJO, 2015).

Outra enterobactéria que pode estar presente no pescado cultivado em ambientes poluídos por esgotos, dejetos e fezes é a *Salmonella* spp. Seu habitat principal é no trato intestinal de aves, reptéis e seres humanos. Peixes capturados em águas límpidas estão geralmente isentos deste tipo de bactéria, sendo sua presença atribuída ao manuseio do pescado por indivíduos infectados, ao contato com superfícies mal higienizadas e contaminação cruzada (OLIVEIRA, 2015; BARTOLOMEU, et al., 2011).

### **1.5. Avaliação sensorial do frescor do pescado e o Método do Índice de Qualidade (MIQ)**

As propriedades sensoriais, o valor nutricional, a salubridade e frescor representam atributos muito especiais, sobretudo no caso do pescado, no qual o frescor assume elevada relevância, pois determina a sua aceitabilidade pelo consumidor e conseqüentemente, o seu valor comercial (GONÇALVES, 2010). Entre os principais métodos de avaliação do frescor, destacam-se os sensoriais, os físico-químicos e os microbiológicos. A avaliação sensorial é o método mais utilizado, em virtude de baixo custo, eficiência e praticidade, sendo comumente realizada no setor de pescado e pelos serviços de inspeção sanitária (SOARES e GONÇALVES, 2012).

Entre as opções de métodos de avaliação sensorial do frescor do pescado, o método do índice de qualidade (MIQ) tomou grande importância na Comunidade Europeia. O esquema conhecido como “Quality Index Method” (QIM), traduzido para o português como o Método do Índice de Qualidade (MIQ), foi originalmente desenvolvido em meados de 1980 na “Tasmanian Food Research Unit”, atual “Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization”. Inicialmente, o MIQ foi desenvolvido para avaliar o peixe inteiro, fresco e armazenado no gelo em refrigeração e hoje em dia, tem sido aplicado em outros produtos, como filés e peixes congelados (AMARAL e FREITAS, 2013).

O MIQ é utilizado na União Europeia como método alternativo para ultrapassar as dificuldades encontradas nas tabelas sensoriais de inspeção sensorial do Regulamento CE nº 2406/96. Nesse esquema as espécies são classificadas em 3 categorias: E (extra), A e B, sendo que extra corresponde à qualidade mais elevada e abaixo do nível B o produto não está próprio para consumo. Esse esquema não leva em consideração as diferenças biológicas entre as espécies, gerando grande deficiência (AMARAL e FREITAS, 2013).

O método do índice de qualidade (MIQ) é um sistema de controle de qualidade do frescor do pescado e baseia-se na avaliação objetiva dos principais atributos sensoriais de cada espécie de peixe. O sistema MIQ é preciso porque é adaptado para cada espécie, considerando as características do próprio peixe, o que permite o desenvolvimento de um sistema de pontuação denominado índice de qualidade (RODRIGUES et al., 2016; SVEINSDOTTIR et al., 2003).

Este método é projetado de modo que um parâmetro de qualidade de um pescado muito fresco recebe pontuação zero (melhor pontuação) e com o progresso da deterioração, a pontuação vai aumentando até atingir a pontuação máxima que corresponde a dois ou três pontos (pior pontuação). As pontuações registradas em cada característica somam-se para dar uma pontuação sensorial total, o denominado Índice de Qualidade (IQ). Quanto mais próximo o IQ estiver de zero, mais fresco o pescado estará (RODRIGUES et al., 2016; SVEINSDOTTIR et al., 2003).

O objetivo do desenvolvimento do MIQ para várias espécies é a obtenção de uma relação linear em que o Índice de Qualidade que deve aumentar com o tempo de armazenagem em gelo. Além de avaliar a qualidade do pescado em questão, o MIQ permite a previsão da validade comercial da espécie estudada. O prazo de validade comercial de peixes é definido como o número de dias que os peixes frescos podem ser mantidos em gelo até que se tornem impróprios para o consumo humano, enfatizando que a validade comercial estimada baseia-se em condições ótimas de captura e armazenamento, ou seja, armazenamento em gelo sem a flutuação de temperatura (AMARAL e FREITAS, 2013; BERNARDI et al., 2013; SANT'ANA et al., 2011).

Quando a correlação linear entre o Índice de Qualidade (IQ) e tempo de armazenamento em gelo é obtido, as pontuações totais de mérito podem ser utilizadas para prever o período de validade comercial restante. Embora o MIQ seja

uma ferramenta importante para prever o fim da validade comercial ou o tempo de rejeição, ele deve ser estimado com a ajuda e o apoio de outros métodos de avaliação, como as análises microbiológicas e físicoquímicas (AMARAL e FREITAS, 2013; BERNARDI et al., 2013; SANT'ANA et al., 2011).

#### **1.6. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas**

A segurança do pescado quanto ao padrão microbiológico é imprescindível, porém, os testes tradicionais de microbiologia apresentam desvantagens quando comparados com métodos sofisticados. De acordo com GANDRA et al (2008), as metodologias oficiais são realizadas em meios de cultura não seletivos e seletivos complementados por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos que embora confiáveis e eficientes, requerem de vários dias a semanas antes dos resultados serem obtidos.

A identificação rápida de patógenos presentes em alimentos é de extrema relevância, tanto para a garantia da qualidade dos produtos, quanto em casos de surtos. Com isso, fez-se necessário a utilização de técnicas baseadas na amplificação de DNA, como é o caso da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MENDONÇA, 2016). A PCR consiste em uma técnica altamente sensível, por meio da qual, são obtidas milhões de cópias de sequências de ácidos nucleicos, por intermédio de uma reação enzimática, a partir de diminutas quantidades de sequências de DNA ou de RNA específicas (GANDRA et al., 2008).

Segundo ANDRADE et al (2010), a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica. Apresenta também diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (GANDRA et al., 2008).

O diagnóstico tradicional, envolvendo os métodos microbiológicos convencionais para determinação da sanidade de alimentos, principalmente no Brasil, continua ainda sendo realizado. Entretanto, visando reduzir ou eliminar inconveniências e erros que possam ter passado pelos métodos microbiológicos, as

técnicas moleculares serão utilizadas com mais frequência, proporcionando, assim, diagnósticos cada vez mais precisos e em curto prazo (ANDRADE et al .,2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver o Método do Índice de Qualidade (MIQ) para o curimba cultivado e aplicá-lo no estabelecimento da sua vida útil. Também foram pesquisadas as condições microbiológicas do curimba fresco.

### 2.2. Objetivos específicos

- Realizar nas amostras de curimba fresco as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Aplicar a técnica de PCR para caracterização genética de bactérias suspeitas de serem patogênicas (*S. aureus* e *Salmonella* spp.).
- Aplicar o Método de Índice de Qualidade para avaliação dos aspectos sensoriais do curimba fresco e conservado em gelo, com estabelecimento da sua vida útil.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O consumo de pescado vem aumentando de forma exponencial em todo o mundo nos últimos anos, sendo a carne do pescado uma importante fonte de proteínas, vitaminas e minerais. A carne proveniente de peixes como o curimba tem baixo teor de gordura e baixo valor calórico, o que incentiva o seu consumo pela população em busca de uma alimentação mais saudável. Diante do aumento do consumo também se faz necessário o aumento da produção através da prática da piscicultura. Como o pescado é considerado um dos alimentos proteicos com maior facilidade de sofrer deterioração, a qualidade da carne deve ser priorizada desde a fase de produção até a fase de comercialização do produto final, sendo a avaliação microbiológica um dos principais métodos de controle da qualidade do pescado.

Além da avaliação microbiológica, a análise sensorial também é uma ferramenta importante na avaliação da qualidade do pescado fresco. Neste trabalho, o desenvolvimento do Método do Índice de Qualidade (MIQ) para o curimba cultivado será importante para estabelecer seu prazo de validade comercial. E através das análises microbiológicas do curimba fresco, resfriado e exposto ao consumo nas peixarias da cidade de Brasília, será possível determinar se essa espécie está sendo comercializada com qualidade e segurança alimentar para o consumidor.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas**

Foram coletadas seis amostras de curimba inteiro e eviscerado, comercializadas num hipermercado de Brasília no período de Março a Julho de 2016. As coletas das amostras foram realizadas no mesmo dia em que se iniciaram as análises laboratoriais, sendo as mesmas transportadas por tempo máximo de uma hora até o laboratório. Para o preparo das amostras, foram pesadas, assepticamente, 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

### **4.2. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas**

Para contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C  $\pm$  1°C por 7 dias para bactérias psicrotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

### **4.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes**

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra. A determinação do NMP de microrganismos é baseada no princípio de que, numa amostra líquida as bactérias podem ser separadas por agitação, resultando numa suspensão em que as células estejam uniformemente distribuídas. A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de



probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra (FENG et al., 2002).

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 ml de cada diluição em uma série de 3 tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais (FENG et al., 2002).

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 2 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG et al., 2002).

**Tabela 2. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.**

**Tabela para 3 tubos, cada um com inoculo de 0.1, 0.01 e 0.001 ml, os NMPs por grama e os intervalos de confiança a 95%.**

Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

**Fonte:** <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>

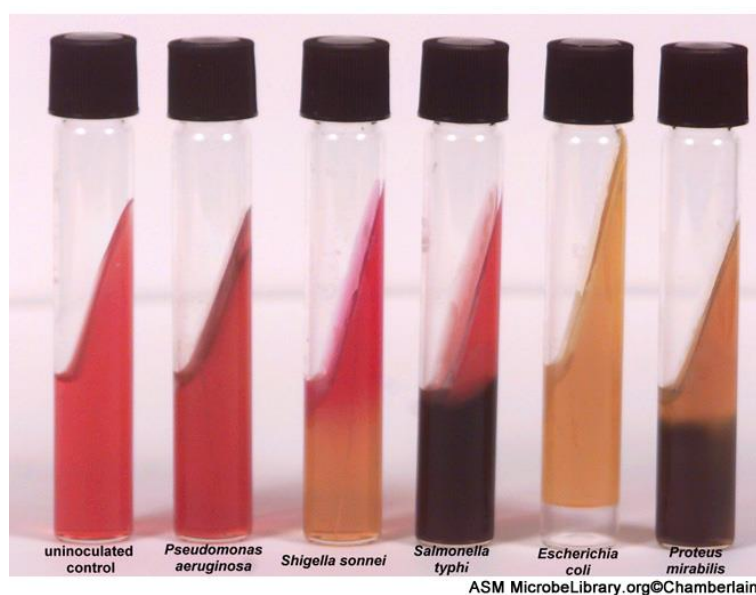
#### **4.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição  $10^{-1}$  das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio Agar *Salmonella Shigella* (Agar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em Agar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo Agar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose

(1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o microrganismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010).

No Agar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás ( $CO_2$ ) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os microrganismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 3). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de  $H_2S$  como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.



Fonte: ASM microbelibrary.org

**Figura 3.** Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI

#### 4.5. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em Agar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

#### 4.6. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de curimba suspeitas de serem patogênicas e cultivadas por 12 h. em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações, descritas a seguir:

Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-

se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

#### 4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *S. aureus* e *Salmonella* sp. foi realizada conforme busca na literatura, para os quais os oligonucleotídeos foram redesenhados no presente estudo.

- entC: anotação descrita para o gene que codifica enterotoxina C do *S. aureus*
- invA: anotação descrita para o gene que codifica proteínas de invasão celular da *Salmonella* spp.

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.**

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
T <sub>m</sub> do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e [Símbolo]G de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.**

Oligonucleotídeo	Sequência (5'3')	Produto	Espécie
entC_F	TTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
invA_F	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>Salmonella</i> spp.
invA_R	CGACAAGACCATCACCAATG		

#### 4.8. PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne<sup>®</sup> modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonunleotídeos foward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o de 100pb ou de 50pb DNAI/HindIII (JENA®).

#### **4.9. Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início foi usado a voltagem de 50 V e após começar a correr o gel, aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pB (pares de bases). Foi adicionado 3 µL de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7 µL de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (que tem função de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

#### **4.10. Método do índice de qualidade (MIQ)**

Foram adquiridos 4 peixes inteiros para a observação inicial, 4 peixes para o treinamento e 4 peixes para o estudo de validação do MIQ. No laboratório os peixes foram eviscerados. Os peixes foram mantidos em gelo (potável e filtrado) dentro de caixas, que foram armazenadas dentro de um refrigerador. Diariamente ou a cada 2 dias foi adicionado gelo fresco nas caixas para repor o gelo derretido.

Para desenvolver o esquema preliminar do MIQ do curimba mantido em gelo, na primeira etapa foram selecionados dois avaliadores com experiência em microbiologia de pescado e avaliação sensorial. A cada dois dias, os peixes foram escolhidos aleatoriamente e examinados por um intervalo de tempo de até 15 dias após o abate. As principais alterações sensoriais nos peixes foram selecionadas e descritas em detalhe no esquema preliminar. A pontuação de 0 a 3 ou 2 pontos de

demérito foi dada para cada mudança de parâmetro avaliado. As observações foram realizadas sob condições padronizadas e em temperatura ambiente.

Na segunda etapa, avaliaram-se os peixes escolhidos aleatoriamente e de acordo com o esquema do MIQ, para estabelecer a correlação entre o IQ e o tempo de estocagem no gelo. No final desta etapa, foi elaborada a versão final do esquema do MIQ. As observações foram realizadas sob condições padronizadas e em temperatura ambiente.

Durante os períodos de armazenamento do curimba no gelo foram realizadas análises microbiológicas com contagem total de mesófilos e psicrotróficos.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises microbiológicas e moleculares

#### 5.1.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

Para as análises microbiológicas, foram coletadas seis amostras de curimba (peixe inteiro e eviscerado), comercializadas num hipermercado de Brasília. A tabela 5 apresenta os resultados da contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras, expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão.

**Tabela 5. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de curimba**

Amostras	Bactérias Mesófilas		Bactérias Psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP
Amostra 1	$1,9 \times 10^5$	$5,18 \pm 0,35$	$4,5 \times 10^6$	$6,65 \pm 0,04$
Amostra 2	$2,8 \times 10^4$	$3,94 \pm 0,82$	$5,0 \times 10^6$	$6,69 \pm 0,04$
Amostra 3	$1,6 \times 10^6$	$6,15 \pm 0,30$	$1,6 \times 10^7$	$7,19 \pm 0,05$
Amostra 4	$1,2 \times 10^6$	$6,07 \pm 0,14$	$1,1 \times 10^7$	$7,04 \pm 0,04$
Amostra 5	$9,8 \times 10^4$	$4,88 \pm 0,36$	$3,2 \times 10^6$	$6,44 \pm 3,19$
Amostra 6	$3,5 \times 10^4$	$4,52 \pm 0,17$	$5,5 \times 10^6$	$6,69 \pm 0,29$

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata, DP = desvio padrão

As amostras de curimba, neste estudo, apresentaram uma contagem de bactérias mesófilas variando de  $2,8 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^6$  UFC/g. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabelece padrões microbiológicos para contagem de bactérias mesófilas em peixes frescos. No entanto, a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002) recomenda que os limites para microrganismos aeróbios mesofílicos não excedam os valores de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g em amostras de peixes refrigerados para consumo humano. Esse

grupo é importante porque inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir altas contagens quando o alimento é mantido à temperatura ambiente.

O número de microrganismos mesófilos encontrados em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Esta determinação permite também obter informação sobre a alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, a falta de controle no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida (SILVA, 2002).

Já para a contagem de psicotróficos, todas as amostras apresentaram valores elevados, variando de  $3,2 \times 10^6$  a  $1,6 \times 10^7$  UFC/g. As amostras 3 e 4 mostraram contagens de bactérias psicotróficas de  $1,6 \times 10^7$  e  $1,1 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente, podendo ser considerados produtos com a qualidade comprometida. Esses microrganismos são responsáveis pela diminuição da vida útil do pescado por constituírem seus principais deterioradores. Baixas temperaturas são utilizadas para retardar reações químicas e a ação das enzimas autolíticas no pescado. Porém, mesmo estando em baixas temperaturas de estocagem, os microrganismos psicotróficos tem a capacidade de deteriorarem o pescado por ações de enzimas proteolíticas e lipolíticas, logo, a proliferação dessas bactérias influencia diretamente o frescor do pescado e sua vida de prateleira (BARTOLOMEU, 2011; TEXEIRA E GARCIA, 2014; LANZARIN et. al., 2011).

Os resultados deste estudo podem ser comparados aos resultados de OLIVEIRA (2015), que também estudou a qualidade microbiológica de peixe de água doce proveniente de aquicultura. OLIVEIRA (2015) obteve valores entre  $8,6 \times 10^3$  a  $6,9 \times 10^6$  para bactérias mesófilas e  $1,9 \times 10^6$  a  $9,3 \times 10^7$  UFC/g para bactérias psicotróficas em amostras de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). A autora ressaltou também que quatro das seis amostras de pintado analisadas apresentaram contagens de psicotróficos elevadas (valores acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g), evidenciando condições higiênicas deficientes no processamento ou condição de refrigeração inadequada.

### 5.1.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

Os resultados obtidos nas análises de determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes nas amostras deste estudo estão demonstrados na tabela 6.

**Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de curimba**

Amostras	Coliformes Totais		Coliformes Termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g $\pm$ DP	NMP/g	Log NMP/g $\pm$ DP
Amostra 1	$1,8 \times 10^2$	$2,24 \pm 0,12$	$8,2 \times 10^1$	$1,57 \pm 0,68$
Amostra 2	$5,9 \times 10^1$	$1,62 \pm 0,50$	$2,0 \times 10^1$	$1,23 \pm 0,34$
Amostra 3	$7,4 \times 10^2$	$2,54 \pm 0,86$	$0,5 \times 10^1$	$0,72 \pm 0,22$
Amostra 4	$1,5 \times 10^1$	$1,17 \pm 0,13$	$1,4 \times 10^1$	$1,13 \pm 0,08$
Amostra 5	$2,2 \times 10^2$	$1,16 \pm 0,55$	$0,4 \times 10^1$	$0,60 \pm 0,22$
Amostra 6	$5,6 \times 10^1$	$1,27 \pm 0,85$	$0,4 \times 10^1$	$0,57 \pm 0,17$

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata, DP = desvio padrão

Do total de amostras analisadas, observou-se que as populações de coliformes totais variaram de  $1,5 \times 10^1$  a  $7,4 \times 10^2$  NMP/g, sendo as amostras 1, 3 e 5 apresentaram os maiores valores. A legislação brasileira não estabelece limites de coliformes totais para o pescado, mas é importante analisar a presença deste grupo de microrganismos, por serem indicadores da qualidade higiênico-sanitária. Elevados números de coliformes totais indicam a necessidade de um controle mais rígido relacionado à higiene de processamento e comercialização do pescado (DOURADO, 2013).

A análise de coliformes termotolerantes tem objetivo de indicar a presença de material fecal na amostra e a partir disso, ser possível a avaliação da presença de patógenos que ofereçam risco de toxi-infecção alimentar. Uma contagem elevada de

coliformes termotolerantes indica deficiência no processo de manipulação e salubridade dos alimentos (SANTOS, 2013). A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina valores de no máximo  $1,0 \times 10^2$  NMP/ g para coliformes termotolerantes no pescado e produtos da pesca. Neste estudo, todas as amostras apresentaram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes, porém permanecendo dentro dos limites permitidos pela legislação.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por DELBEM et. al. (2010), que verificaram a enumeração de  $2,1 \times 10^1$  NMP/g para coliformes termotolerantes no tempo zero de estocagem no gelo em amostras de pintado coletadas de pescadores artesanais da cidade de Corumbá-MS, no Rio Paraguai. No entanto, após 3 dias de estocagem no gelo a enumeração de coliformes termotolerantes subiu para  $5,0 \times 10^2$  NMP/g, mostrando que esse pescado se tornou inadequado para consumo humano. Já Fontes et al. (2007) obtiveram resultados elevados para coliformes totais em sete do total de 23 amostras de pescado analisadas, porém sem o isolamento de *Escherichia coli*.

### **5.1.3. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

---

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, móveis em sua grande maioria devido à presença de flagelos peritríquios. Crescem numa faixa de temperatura de 5 a 46°C, entretanto, a temperatura ótima é de 35 a 43°C. Crescem bem em pH entre 3,8 a 9,5, sendo 7 o pH ideal. Atividade de água ( $A_w$ ) mínima para crescimento é de 0,94 (OLIVEIRA et al., 2013)

Assim como as carnes de bovinos, de suínos e de frango, os produtos da pesca (peixes e crustáceos) também podem ser veiculadores de microrganismos patogênicos para o homem. Muitas vezes no pescado a presença de patógenos como a *Salmonella* spp. é fruto de contaminação ambiental, devido a despejos de esgoto nas águas dos rios, lagos e mar. A contaminação por *Salmonella* spp. em produtos da pesca também pode ser proveniente de má manipulação na despesca e no processamento (DUARTE et al., 2010). A Tabela 7 apresenta os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de curimba fresco.

Tabela 7. Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de curimba.

Amostras	Agar SS *	Agar TSI **	Resultado da PCR <i>Salmonella</i> spp.
Amostra 1	Suspeito	Suspeito	Confirmado
Amostra 2	ND	ND	ND
Amostra 3	ND	ND	ND
Amostra 4	Suspeito	Suspeito	Confirmado
Amostra 5	ND	ND	ND
Amostra 6	ND	ND	ND

\* colônias não fermentadoras de lactose/ pigmento preto; \*\* superfície do meio vermelho e base amarela ou com pigmento preto; ND = não detectado.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece ausência de *Salmonella* spp. no pescado “in natura” resfriado ou congelado. Neste estudo, as amostras 1 e 4 estavam impróprias para o consumo humano, pois apresentaram cepas de *Salmonella* spp, confirmadas geneticamente (ANEXO 1, Figura A).

Os resultados deste estudo podem ser comparados aos resultados de OLIVEIRA (2015), que também obteve ocorrência de *Salmonella* spp. em duas das seis amostras de pintado cultivado analisadas. No trabalho de DUARTE et al. (2010) sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em pescado no nordeste do Brasil, das 50 amostras de peixes analisadas, apenas duas amostras (4,0%) apresentaram ocorrência de *Salmonella*.

#### 5.1.4. Contagem de *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* em altas quantidades em alimentos constituem risco à saúde humana, por causa do seu potencial toxigênico. As toxinas estafilocócicas são higroscópicas solubilizando-se com facilidade em água e soluções salinas, o que pode permitir uma rápida difusão no alimento contaminado. Tais toxinas são termoresistentes, não sendo afetadas pelo cozimento, nem pela exposição posterior

às enzimas digestivas presentes no trato gastrointestinal humano (JUNIOR et al, 2015). A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece um limite de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g para *S. aureus* em peixe fresco. A Tabela 8 apresenta os resultados da contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de curimba fresco.

**Tabela 8. Contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de curimba.**

Amostras de curimba	Colônias fermentadoras de manitol, após coloração de Gram ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	
	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP
Amostra 1	ND	ND
Amostra 2	ND	ND
Amostra 3	$6,5 \times 10^2$	$2,73 \pm 0,37$
Amostra 4	ND	ND
Amostra 5	ND	ND
Amostra 6	ND	ND

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata, DP = desvio padrão, ND = não detectado

Das seis amostras de curimba analisadas, apenas uma amostra apresentou contagem de *S. aureus*, porém permanecendo dentro dos limites permitidos pela legislação. Assim, apesar da baixa contagem de *S. aureus* no presente estudo, é importante salientar que as boas práticas de higiene devem ser constantemente aplicadas pelos manipuladores, já que este microrganismo pode estar presente nas mãos e mucosas dos mesmos.

Quanto à análise molecular, foi observado que das quatro colônias suspeitas de *S. aureus*, isoladas da amostra número 3, apenas três foram confirmadas na análise de PCR para a presença do gene *entC*, ou seja, são potenciais produtoras de enterotoxina C, conforme descrito na tabela 9 e ANEXO 1 (Figura B).

**Tabela 9. Identificação por meio de PCR de bactérias de *Staphylococcus aureus* isoladas das amostras de curimba comercializadas em Brasília – DF.**

Número da colônia	Amostra	Resultado Molecular
JU13	3	<i>S. aureus</i> +
JU19	3	<i>S. aureus</i> +
JU75	3	<i>S. aureus</i> -
JU76	3	<i>S. aureus</i> +
Controle Positivo		
CP	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +
CN	<i>S. aureus</i> -	<i>S. aureus</i> -

Outros trabalhos também relataram baixas contagens de *Staphylococcus aureus* em pescados. SANTOS et al. (2008), analisaram a carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*) congelada de dois principais distribuidores da região de Belo Horizonte (MG) e encontraram apenas duas amostras positivas para *S. aureus* entre 20 amostras analisadas. DUARTE et al. (2010), obtiveram resultados de contagens de *Staphylococcus aureus* menores que  $1,0 \times 10^2$  UFC/g para as amostras de peixe fresco provenientes da região nordeste. SOARES et al. (2012), pesquisaram a presença de *S. aureus* em tilápia do Nilo armazenada em gelo, procedente de um viveiro localizado no município de Apodi-RN e verificaram a ausência deste microrganismo.

### 5.1.5. Método do índice de qualidade (MIQ) para o curimba de cativo (peixe inteiro e eviscerado)

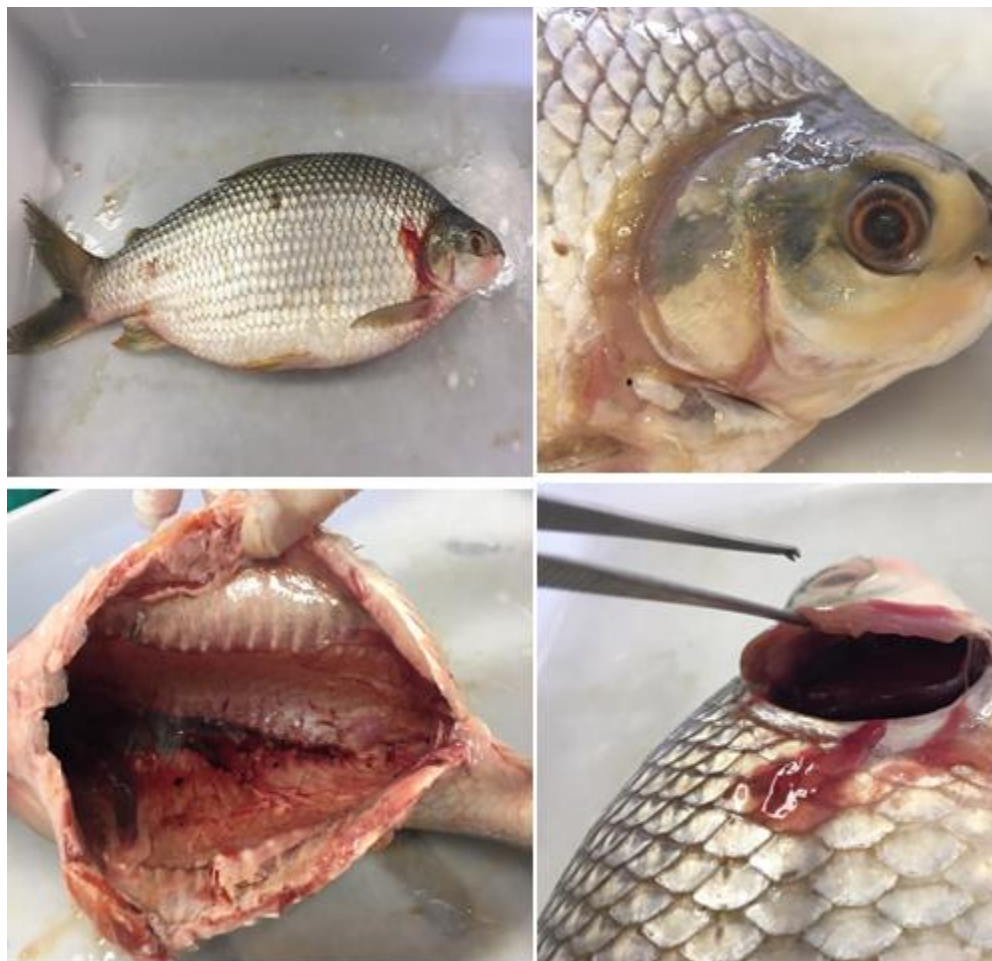
Na primeira etapa estabelecida para desenvolver o esquema do MIQ, os peixes foram fotografados. Estabeleceu-se o esquema do MIQ do curimba (Tabela 10), atingindo-se pontuação máxima do índice de qualidade (IQ) de 18 pontos de demérito, incluindo 8 parâmetros de qualidade que foram agrupados em 5 atributos sensoriais principais (aparência, musculatura, guelras, área do abdômen e olhos).

**Tabela 10. Esquema do MIQ do curimba de cativo (peixe inteiro).**

Parâmetros de qualidade		Descrição	Pontos
APARÊNCIA	Pele	Cor prateado, vivo, brilhante	0
		Cor prateado, com brilho menos intenso	1
		Cor prateado, com tonalidade amarela	2
		Cor prateado, com intensificação da tonalidade amarela	3
	Odor	Odor de peixe fresco	0
		Odor de camarão	1
		Odor de carne velha	2
		Odor pútrido	3
	Aspecto em torno da cabeça	Prateado	0
		Amarelado	1
		Amarelo escuro	2
	Muco na pele	Sem muco	0
		Muco fino	1
Muco espesso		2	
OLHOS	Aspecto	Pupila negra, córnea transparente e olhos convexos ocupando toda órbita	0
		Pupila negra, córnea opaca e olhos chatos	1
		Pupilas e córneas opacas, olhos afundados (côncavo)	2
		Olhos estufaram e amarelaram e alguns perderam definição de córnea e pupila	3
CARNE	Aspecto	Laranja viva, brilhante, firme	0
		Laranja opaca, firme	1
		Laranja opaca, amolecida com espinhos desprendendo da carne	2
ÁREA DO ABDÔMEN	Aspecto	Fresco, brilhante, vivo	0
		Opaco, cheiro neutro	1
		Opaco, velho e com odor deteriorado	2
GUELRAS	Cor	Vermelho escuro	0
		Marrom	1
SOMATÓRIA MÁXIMA (ÍNDICE DE QUALIDADE)			18



As figuras 4 e 5 apresentam uma amostra de curimba fresco, com IQ zero e as alterações sensoriais de uma amostra deteriorada com IQ de 18 pontos de demérito.



**Figura 4. Amostra com IQ ZERO**– Pele de cor prateada, viva e brilhante. Odor de peixe fresco. Aspecto prateado em torno da cabeça. Sem muco na pele. Olhos com pupila negra e córnea transparente. Musculatura da carne de cor laranja viva, brilhante e firme. Abdômen fresco, brilhante e vivo. Guelras de cor avermelhada escura.



**Figura 5. Amostra com IQ 18** - Pele de cor prateada, com intensificação da tonalidade amarela. Aspecto amarelo escuro em torno da cabeça. Muco espesso. Odor pútrido. Olhos estufaram e amarelaram. Musculatura de cor laranja opaca, com carne amolecida com espinhos desprendendo da carne. Abdômen opaco, velho e com odor deteriorado. Guelra de cor amarronzada.

Na segunda etapa, para a validação do MIQ, avaliaram-se os peixes escolhidos aleatoriamente e de acordo com o esquema do MIQ, para estabelecer a correlação entre o IQ e o tempo de estocagem no gelo (Tabela 11 e Figura 5). Durante esse período foram realizadas análises microbiológicas com contagem total de mesófilos e psicrotróficos.

**Tabela 11. Índice de qualidade (IQ) e tempo de estocagem em gelo (em dias) para o esquema do MIQ do curimba (peixe inteiro).**

<b>Tempo de estocagem no gelo em dias</b>	<b>IQ</b>	<b>Classificação do frescor</b>
0	0	Extra fresco, com alta qualidade
1	0	Extra fresco, com alta qualidade
2	3	Fresco, com boa qualidade
6	9	Menos fresco, qualidade satisfatória
8	12	Menos fresco, no limite de consumo
13	18	Rejeitado

O prazo de validade comercial do curimba (peixe inteiro) ficou estabelecido entre 6 e 8 dias de estocagem no gelo. Nesse período, a média do IQ ficou entre 9 e 12 pontos de demérito. Várias alterações sensoriais foram observadas como o começo do odor semelhante ao de camarão ao abrir a caixa, que se dissipava completamente ao manusear os peixes, os olhos afundados que se apresentaram com as pupilas e córneas opacas, as guelras de cor vermelho escuro, leve viscosidade na pele e o abdômen começando a ficar com aspecto de velho.

A partir de 13 dias de estocagem no gelo, o pescado já estava rejeitado, com odor deteriorado e a carne com aspecto de velho (opaca). As alterações sensoriais típicas da deterioração progrediram rapidamente, com o aparecimento de odor deteriorado bastante perceptível no abdômen, a carne ficou com a textura amolecida, esfarelando, os espinhos se soltando facilmente e as guelras de cor amarronzada. As características mais marcantes de deterioração neste tipo de pescado foram à cor do peixe que se transformou de prateado vivo a completamente amarelado, principalmente na região da face, porém as escamas permaneceram bem aderidas, mesmo o peixe estando velho.

Existem na literatura estudos semelhantes utilizando peixes de água doce, como o realizado por OLIVEIRA (2015) que aplicou o método de índice de qualidade (MIQ) para estabelecimento do prazo de validade comercial para amostras de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) frescas e estocadas em gelo. Neste estudo, a autora concluiu que o pintado deve ser consumido entre 8 e 10 dias de estocagem no gelo e foi estabelecido de zero a 16 pontos de demérito no IQ. Já LANZARIN et al. (2016) desenvolveu o MIQ para o pintado amazônico (*P. fasciatum* x *L.*

*marmoratus*), estabelencendo de zero a 18 pontos de demérito no IQ. Os resultados mostraram que a vida útil no gelo do pintado amazônico eviscerado é de 12 dias. RODRIGUES et al. (2016) estipulou também com base no desenvolvimento do método de índice de qualidade, uma vida útil de 15 dias para a tilápia do Nilo eviscerada armazenada em gelo. Os valores de IQ variavam de 0 a 19 pontos de demérito. Logo, evidencia-se a que a pontuação do MIQ deve ser elaborada de forma específica para cada espécie.

A Tabela 12 apresenta os resultados das análises microbiológicas com contagem total de microrganismos mesófilos e psicrotróficos no período de estocagem de 8 dias do curimba em gelo.

**Tabela 12. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de curimba mantidas em gelo por 8 dias.**

Tempo de estocagem no gelo em dias	IQ	Bactérias mesófilas UFC/g	Bactérias mesófilas log UFC/g	Bactérias psicrotróficas UFC/g	Bactérias psicrotróficas log UFC/g
0	0	$5,1 \times 10^4$	$4,70 \pm 0,07$	$3,2 \times 10^6$	$6,44 \pm 3,19$
1	0	$5,1 \times 10^4$	$4,70 \pm 0,07$	$2,4 \times 10^7$	$7,38 \pm 0,04$
2	3	$2,6 \times 10^5$	$5,41 \pm 0,14$	$2,4 \times 10^7$	$7,38 \pm 0,05$
6	9	$3,8 \times 10^5$	$5,57 \pm 0,08$	$2,9 \times 10^8$	$8,46 \pm 0,03$
8	12	$1,5 \times 10^6$	$6,17 \pm 0,15$	$2,3 \times 10^8$	$8,35 \pm 0,11$

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata

O curimba fresco, com alta qualidade (IQ = 0) apresentou contagem de mesófilos de  $5,1 \times 10^4$  UFC/g. No 6º dia de estocagem no gelo, quando o curimba estava menos fresco, a contagem de mesófilos foi de  $3,8 \times 10^5$  UFC/g. E após 8 dias de estocagem no gelo quando o pescado estava no limite de consumo a contagem aumentou para  $1,5 \times 10^6$  UFC/g. Já a contagem de bactérias psicrotróficas foi maior que a contagem de bactérias mesófilas desde o começo da estocagem do curimba no gelo, iniciando-se em  $3,2 \times 10^6$  UFC/g no tempo zero. Após 2 dias de estocagem no gelo essa contagem aumentou para  $2,4 \times 10^7$  UFC/g e entre 6 e 8 dias de estocagem no gelo, quando o curimba estava menos fresco e no limite de consumo, obteve-se elevada contagem de bactérias psicrotróficas, com valores entre  $2,3 \times 10^8$

e  $2,9 \times 10^8$  UFC/g. De acordo com a ICMSF (2005), peixes de águas tropicais, como o curimba, têm tipicamente níveis mais elevados de bactérias mesófilas que peixes de águas temperadas. No entanto, quando armazenados no gelo, as bactérias psicrotróficas assumem papel relevante no processo de deterioração.

No trabalho de Lanzarin et al. (2016), os autores também evidenciaram o aumento da contagem de bactérias durante o período de estocagem no gelo no desenvolvimento do MIQ para outra espécie de pescado de água doce. A vida útil do pintado amazônico estocado no gelo foi de 12 dias, quando a contagem de bactérias mesófilas estava em 6,5 log UFC/g e a contagem de bactérias psicrotróficas estava em 7,7 log UFC/g.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, os resultados da avaliação microbiológica de 6 amostras de curimba fresco e exposto ao consumo em um hipermercado da cidade de Brasília, mostraram que 2 amostras estavam impróprias para o consumo, devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente).

A presença de patógenos entéricos importantes em doenças de origem alimentar como *Salmonella* entérica nas amostras de curimba, sugere que água dos criatórios deve estar contaminada com material fecal. Portanto, o monitoramento da qualidade da água dos criatórios é de suma importância para garantir a produção de peixes com boa qualidade e segurança alimentar.

Por meio da aplicação do Método do Índice de Qualidade (MIQ) foi possível concluir que, o prazo de validade comercial do curimba fresco, conservado em gelo é de 6 a 8 dias de estocagem, pois após esse tempo o peixe adquiriu características sensoriais que o tornaram insatisfatório para consumo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, 2010.
- AMARAL, G. V.; FREITAS, D. G. C. Método do índice de qualidade na determinação do frescor de peixes. **Ciência Rural**, v.43, n.11, p.2093-2100, 2013.
- ARAÚJO, Y. F. de. **Avaliação da qualidade do gelo de manutenção e da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada comercializada na cidade de Brasília - Distrito Federal**. 90p. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia. Brasília-DF, 2015.
- AYROZA, L. M. S. **Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, rio Paranapanema, SP/PR**. 92 p. Tese de Doutorado, UNESP, Campus de Jaboticabal, 2009.
- BALDIN, J. C.; **Avaliação da qualidade microbiológica do gelo utilizado na conservação de pescado**. Dissertação (Mestrado), 39p., Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011.
- BARBOSA, M. M. C. **Qualidade higiênico-sanitária e ocorrência de *Aeromonas sp.* e *Escherichia coli* em tilápias comercializadas no varejo**. Tese (doutorado) 91 p. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2013.
- BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLABONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.
- BERNARDI, D. C.; MÁRSICO, E. T.; FREITAS, M. Q. Quality Index Method (QIM) to assess the freshness and shelf life of fish. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 587-598, 2013.
- BRABO, M. F. et al. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.
- BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA, Resolução Nº12 de 02 de janeiro de 2001**. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:< [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01\\_rde.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rde.htm)>. Acesso em 29 de março de 2017.

COSTA et al. Criação da curimatã comum, *Prochilodus cearaensis* Steindachner, 1911, em tanque rede, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.3, p. 482-492, 2015.

CUADRADO, H; EDREY, E. **Indução da atividade espermática e desenvolvimento embrionário e larval de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. Tese (Doutorado), 182 p., UFLA, Lavras, 2013.

DELBEM, A. C. B.; GARBELINI, J. S.; LARA, J. A. F. **Avaliação Microbiológica do Pintando (*Pseudoplatystoma corruscan*) obtido no Rio Paraguai (Pantanal) e conservado em gelo**. SIMPAN, Corumbá – MS, 2010.

DOURADO, W. G. A. **Avaliação da qualidade do salmão fresco e resfriado comercializado nos mercados varejistas das cidades de Ceilândia e Taguatinga – DF**. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, DF, 2013.

DUARTE, D. A. M. et al. Ocorrência de *Salmonella spp.* e *Staphylococcus coagulase* positiva em pescado no nordeste, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 711-713, 2010.

ECHEVENGUA, M. M. et al. Qualidade da polpa da carpa húngara transportada viva ou no gelo. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 2004-2010, 2008.

FONTES, M. C.; ESTEVES, A.; CALDEIRA, F.; SARAIVA, C.; VIEIRAPINTO M.; MARTINS C. Estado de frescor e qualidade higiênico-sanitárias do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1308-1315, 2007.

FURTADO, A. A. L. 2016. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CON T000fid5gm ye02wyiv80z4s473lakm7pt.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CON T000fid5gm ye02wyiv80z4s473lakm7pt.html)>. Acesso em 20 de março de 2017.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. G. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GONÇALVES, A. C. **Qualidade e valorização em aquicultura: propriedades sensoriais e período de conservação útil de peixe e bivalves**. Tese (Doutorado) 140 p., Universidade de Lisboa, 2010.

JUNIOR, A. C. S. S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positiva e coliformes termotolerantes em Jaraqui, *Semaprochilodus brama* (Valenciennes, 1850) comercializado na feira do pescado, Macapá-AP. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 32-36, 2015.

ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.



ICMSF – **Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management.** New York: Kluwer Academic, 2002.

KALOUS, L. et al. The South American freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Actinopterygii: Characiformes: Prochilodontidae): new species in Vietnamese aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 955–958, 2012.

LANZARIN, M. et al. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrótrófos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1541-1546, 2011.

MACHADO, M. R. F; FORESTI, F. Rendimento e composição química do filé de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, Brasil, **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 224, p. 663-670, 2009.

MENDONÇA, J. F. M. **Deteção de células viáveis de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho pela técnica de PCR em tempo real.** Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2016.

NASCIMENTO, A. F. D. **Efeito de crioprotetores, diluidores e osmolalidade na qualidade espermática de *Prochilodus lineatus* e *Brycon orbignyanus*.** Tese (Doutorado) 88 p., UFLA, Lavras, 2013.

OLIVEIRA, M. C. S. D. **Avaliação microbiológica e aplicação do método do índice de qualidade (MIQ) para estudo do prazo de validade comercial do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) estocado em gelo, comercializado em Brasília – DF.** 59 p. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia, Brasília, DF, 2015.

OLIVEIRA, R. C. O. Panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia**, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Salmonella* enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.9, n.1, p. 1047-1972, 2013.

ORFÃO, L. H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836).** Dissertação (Mestrado), 86 p., UFLA, Lavras, 2006.

PEREIRA, J. I. O. **Avaliação da qualidade e segurança microbiológica de trutas de aquicultura.** Dissertação (Mestrado), 94 p., Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 2013.

REGULAMENTO (CE) N° 2406/96 do conselho de 26 de Novembro de 1996 relativo à fixação de normas comuns de comercialização para certos produtos da pesca.

RODRIGUES, T. P. et al. Quality index method (QIM) and quantitative descriptive analysis (QDA) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) quality indices. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 3, p. 209-216, 2016.

SANT'ANA, L.S. et al. Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.2253-2259, 2011.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, E. C. B. **Métodos de abate e qualidade da tilápia do Nilo**. 97 p., Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal - SP, 2013.

SANTOS, T. M. et al. Inspeção visual e avaliações bacteriológica e físico-química da carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*) congelada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 1538-1545, 2008.

SANTIAGO, J. A. S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados - revisão. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, 2013.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate**. São Paulo. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

SVEINSDOTTIR, K.; HYLDIGB, G.; MARTINSDOTTIRA, E.; JØRGENSENB, B.; KRISTBERG, K. Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), **Food Quality and Preference**, v. 14, p. 237–245, 2003.

TAFFAREL, T. R. **Osmolalidade e composição dos meios de imobilização durante o resfriamento do sêmen de *Prochilodus lineatus***. Dissertação (Mestrado), 58 p., UFLA, Lavras, 2013.

TEIXEIRA, L. C.; GARCIA, P. P.C. Qualidade do pescado: captura conservação e contaminação. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 2, n. 3, p. 1-15, 2014.

TONIAL, I. B.; OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 1, p. 91-96, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 551-556, 2010.

ZOCHE F., SILVA, W. P. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 187-193, 2012.

## ANEXO 1

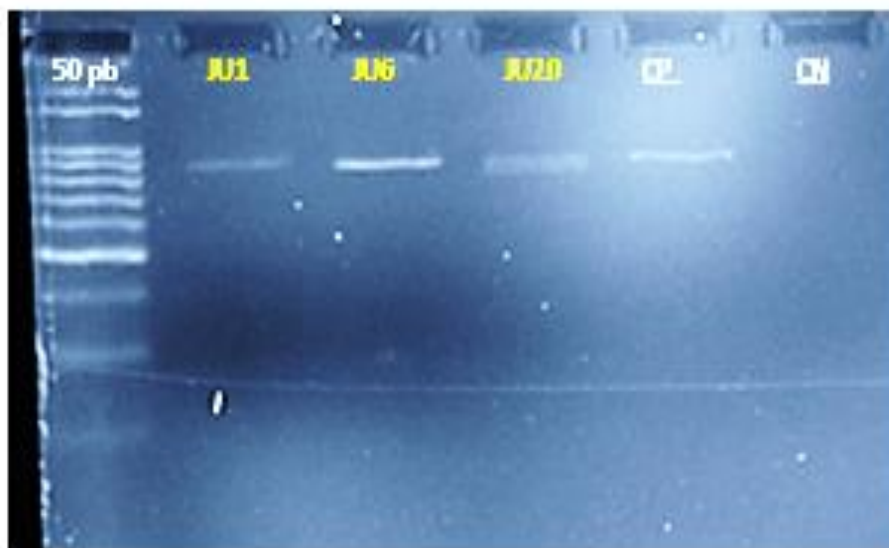


Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella enterica* M = marcador de 100 pb; JU1 a JU6 = amostras deste estudo com amplicons de *invA* (445 pb) CP= controle positivo ATCC 14028; CN = Controle Negativo.



Figura B. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 100pb = marcador de 100 pb; JU13 a JU 76 = amostras deste estudo com amplicons de *entC* (401 pb); CP= controle positivo ATCC 33862; CN= Controle Negativo.